

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/005612

International filing date: 18 March 2005 (18.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2004-081034  
Filing date: 19 March 2004 (19.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 12 May 2005 (12.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

18. 3. 2005

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2 0 0 4 年 3 月 1 9 日

出 願 番 号  
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 0 8 1 0 3 4

パリ条約による外国への出願  
に用いる優先権の主張の基礎  
となる出願の国コードと出願  
番号

The country code and number  
of your priority application,  
to be used for filing abroad  
under the Paris Convention, is

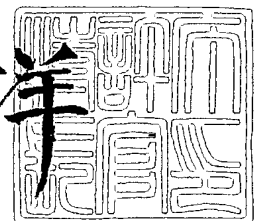
J P 2 0 0 4 - 0 8 1 0 3 4

出 願 人  
Applicant(s): 東洋紡績株式会社  
日本碍子株式会社

2 0 0 5 年 4 月 2 0 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川 洋



【書類名】 特許願  
【整理番号】 NP04076-YS  
【提出日】 平成16年 3月19日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 G01N 33/483  
C07H 21/00

【発明者】  
【住所又は居所】 愛知県名古屋市長区瑞穂区須田町 2 番 5 6 号 日本碍子株式会社内  
【氏名】 川瀬 三雄

【発明者】  
【住所又は居所】 愛知県名古屋市長区瑞穂区須田町 2 番 5 6 号 日本碍子株式会社内  
【氏名】 吉田 安子

【発明者】  
【住所又は居所】 愛知県名古屋市長区瑞穂区須田町 2 番 5 6 号 日本碍子株式会社内  
【氏名】 山田 和成

【発明者】  
【住所又は居所】 福井県敦賀市東洋町 1 0 番 2 4 号 東洋紡績株式会社 敦賀バイオ研究所内  
【氏名】 宝田 裕

【発明者】  
【住所又は居所】 大阪府大阪市北区堂島浜二丁目 2 番 8 号 東洋紡績株式会社内  
【氏名】 橋本 幸蔵

【特許出願人】  
【識別番号】 000003160  
【氏名又は名称】 東洋紡績株式会社

【特許出願人】  
【識別番号】 000004064  
【氏名又は名称】 日本碍子株式会社

【代理人】  
【識別番号】 100093230  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 西澤 利夫  
【電話番号】 03-5887-0201

【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 009911  
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】  
【物件名】 特許請求の範囲 1  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 図面 1  
【物件名】 要約書 1

**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

遺伝子の一塩基多型を検出するための DNA アレイであって、遺伝子ポリヌクレオチドにハイブリダイズする配列部分が遺伝子の第 1 の多型形態に正確に相補的である 1 以上のプローブからなる第 1 のプローブスポット群と、同配列部分が遺伝子の第 2 の多型形態に正確に相補的である 1 以上のプローブからなる第 2 のプローブスポット群とを固相基体上に有し、第 1 プローブスポット群と第 2 プローブスポット群のそれぞれを構成するプローブスポットは、プローブスポット毎にプローブの長さが異なる、ことを特徴とする DNA アレイ。

**【請求項 2】**

第 1 プローブスポット群と第 2 プローブスポット群は、それぞれ、2～10 のプローブスポットからなる請求項 1 の DNA アレイ。

**【請求項 3】**

2～10 のプローブスポットが、そのプローブの長さの順に配置されている請求項 2 の DNA アレイ。

**【請求項 4】**

請求項 1 から 3 のいずれかの DNA アレイを少なくとも含む、遺伝子の一塩基多型を検出するためのキット。

**【請求項 5】**

請求項 1 から 3 のいずれかの DNA アレイを用いて遺伝子の一塩基多型を検出する方法であって、以下のステップ：

- (a) 被験遺伝子から、標識ポリヌクレオチドを調製するステップ；
  - (b) 標識ポリヌクレオチドをプローブ付固相基体に接触させるステップ；
  - (c) DNA アレイ上のプローブにハイブリダイズした標識ポリヌクレオチドより得られるシグナルを測定するステップ；
- を含むことを特徴とする一塩基多型の検出方法。

**【請求項 6】**

前記ステップ (c) において測定された、前記第 1 のプローブスポット群と前記第 2 のプローブスポット群のそれぞれのシグナルを比較する請求項 5 の一塩基多型の検出方法。

**【請求項 7】**

請求項 1 から 3 のいずれかの DNA アレイを用いて、遺伝子の一塩基多型を検出するための適切なプローブ長を決定する方法であって、以下のステップ：

- (a) 被験遺伝子から、標識ポリヌクレオチドを調製するステップ；
- (b) 標識ポリヌクレオチドを DNA アレイに接触させるステップ；
- (c) DNA アレイ上の各プローブに結合した標識ポリヌクレオチドの標識シグナルを測定し、

以下の基準：

- (i) 被験遺伝子がホモ接合性第 1 多型形態の場合に第 1 のプローブスポット群に標識シグナルが観察されること、
  - (ii) 被験遺伝子がホモ接合性第 2 多型形態の場合に第 2 のプローブスポット群に標識シグナルが観察されること、
  - (iii) 被験遺伝子がヘテロ接合性多型形態の場合に第 1 のプローブスポット群と第 2 のプローブスポット群とに同程度の標識シグナルが観察されること、
- を満たすプローブスポットのプローブ長を、その遺伝子の一塩基多型を検出するための適切なプローブ長と決定することを特徴とする方法。

**【請求項 8】**

遺伝子の一塩基多型を検出するための DNA アレイであって、遺伝子ポリヌクレオチドにハイブリダイズする配列部分が遺伝子の第 1 の多型形態に正確に相補的である 1 以上のプローブからなる第 1 のプローブスポットと、同配列部分が遺伝子の第 2 の多型形態に正確に相補的である 1 以上のプローブからなる第 2 のプローブスポットとを固相基体上に有

し、第 1 および第 2 のプローブスポットを構成するプローブ長が、請求項 7 の方法で決定された長さである DNA アレイ。

## 【書類名】明細書

## 【発明の名称】DNAアレイと一塩基多型の検出方法

## 【技術分野】

## 【0001】

この出願の発明はDNAアレイと一塩基多型の検出方法に関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、一塩基多型をより正確に検出することのできるDNAアレイと、このDNAアレイを用いた一塩基多型の検出方法に関するものである。

## 【背景技術】

## 【0002】

ポストゲノムの時代を迎え、ヌクレオチド配列中の塩基種を正確に、効率よく、さらには低コストで検出するための新しい技術が求められている。例えば、SNP (Single Nucleotide Polymorphism: 一塩基多型) はヒトゲノムに約0.1% (約1000塩基に一塩基) の割合で存在する最も頻度の高い多型である。すなわち、この一塩基多型とは、ゲノム遺伝子の一塩基が他の塩基に置換することによって、例えば野生型がG-C塩基対であるのに対し、多型形態ではA-T塩基対となっている状態を意味する。また二媒体染色体のそれぞれの対立遺伝子が多型形態である場合 (ホモ接合型多型形態) と、一方が野生型、他方が多型形態である場合 (ヘテロ接合型多型形態) とが存在する。

## 【0003】

このような一塩基の変異は、例えばコドン変異による変異アミノ酸の合成 (ミスセンス変異) や終止コドンの生成による不完全タンパク質の合成 (ナンセンス変異) を生じさせる場合がある。従って、SNPの有無が様々な疾病にも関連することが明らかになりつつあり (例えば肺癌に関するp53遺伝子のSNP: 非特許文献1)、診断や遺伝的治療等を目的としてSNPの有無を正確に判定すること (SNPタイピング) の重要性が強く認識されてきている。また、このSNPは疾患易罹患性や薬剤反応性に関連する遺伝子を探索する際の有用な多型マーカーでもあり、テーラーメイド医療のための重要な遺伝子情報としても注目されている。

## 【0004】

SNPタイピングの方法としては、「ハイブリダイゼーション効率を利用した方法」、「酵素認識効率を利用した方法」、「電気的手法を利用した方法」等が知られているが、特にハイブリダイゼーション効率を利用した方法は、DNAアレイ (例えば特許文献1-4、非特許文献2、3参照) への適用が様々な検討されており、例えば非特許文献4にはDNAアレイを用いたBRCA1遺伝子SNPの検出例が報告されている。

## 【0005】

このSNP検出用のDNAアレイは、例えば、標的遺伝子の野生型配列に相補的な第1プローブスポットと、その遺伝子の一塩基多型配列に相補的な第2プローブスポットとを固相基体上に配置している。そして、SNPの検出に当たっては、蛍光標識プライマーを用いたPCR増幅等の手段によって調製された標的遺伝子cDNAをこのDNAアレイに接触させる。標的遺伝子が野生型の場合、その標識cDNAは第1プローブにハイブリダイズし、第1プローブのスポットからのみ蛍光シグナルが得られる (ホモ接合型野生型形態)。一方、標的遺伝子の両方の対立遺伝子がSNPの場合には、第2プローブスポットのみから蛍光シグナルが得られ (ホモ接合型SNP形態)、一方の対立遺伝子がSNPの場合には、第1プローブスポットと第2プローブスポットとの両方に同程度の蛍光シグナルがえられる (ヘテロ接合型SNP形態)。

【特許文献1】米国特許第5,474,796号明細書

【特許文献2】米国特許第5,605,662号明細書

【特許文献3】国際公開第95/251116号パンフレット

【特許文献4】国際公開第95/35505号パンフレット

【非特許文献1】Biros et al. Neoplasma 48(5):407-11, 2001

【非特許文献2】Schena, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93:10614-10619, 1996

【非特許文献3】Heller, R. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:2150-2155, 1997

【非特許文献4】Hacia JG et al. Nat. Genet. 14:441-447, 1996

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

DNAアレイを用いたSNP検出では、それぞれのプローブスポットの蛍光シグナルを指標として明確に野性型形態、ホモ接合型SNP形態、ヘテロ接合型SNP形態を区別することは容易ではない。すなわち、野性型遺伝子と多型遺伝子のそれぞれに由来する標識cDNAは一塩基のみの違いである。従って、野性型cDNAの多くはそれに完全に相補的な野性型プローブ（第1プローブ）にハイブリダイズするが、一部は一塩基が異なる第2プローブにもハイブリダイズする。同様に多型cDNAも一部は第1プローブにもハイブリダイズする。そこでDNAアレイによるSNP検出は、第1プローブスポットと第2プローブスポットのそれぞれの蛍光シグナルを比較することによって行われるが、両者のシグナル強度の比較が困難な場合があり、結果として誤ったSNP判定を行ってしまうという不都合が存在した。

【0007】

そこでこの出願の発明は、より正確なSNP検出を可能とするDNAアレイと、このDNAアレイを用いたSNP検出方法を提供することを課題としている。

【0008】

さらにこの出願の発明は、DNAアレイを用いたSNP検出において、より正確な検出を可能とするプローブ長を決定する方法と、この方法により決定された特定長のプローブを備えたDNAアレイを提供することを課題としている。

【課題を解決するための手段】

【0009】

この出願の発明者らは、SNP検出の対象となる験遺伝子毎に、SNP形態を正確に判定するための最適標識シグナルを得ることのできるプローブ長が異なることを見出してこの発明を完成させた。

【0010】

この出願は、前記の課題を解決するための第1の発明として、遺伝子の一塩基多型を検出するためのDNAアレイであって、遺伝子ポリヌクレオチドにハイブリダイズする配列部分が遺伝子の第1の多型形態に正確に相補的である1以上のプローブからなる第1のプローブスポット群と、同配列部分が遺伝子の第2の多型形態に正確に相補的である1以上のプローブからなる第2のプローブスポット群とを固相基体上に有し、第1プローブスポット群と第2プローブスポット群のそれぞれを構成するプローブスポットは、プローブスポット毎にプローブの長さが異なる、ことを特徴とするDNAアレイを提供する。

【0011】

この第1発明のDNAアレイにおいては、第1プローブスポット群と第2プローブスポット群は、それぞれ、2～10のプローブスポットからなることを好ましい態様としている。

【0012】

またこの第1発明の前記態様においては、2～10のプローブスポットが、そのプローブの長さの順に配置されていることを好ましい態様としている。

【0013】

この出願は、第2の発明として、前記第1発明のDNAアレイを少なくとも含む、遺伝子の一塩基多型を検出するためのキットを提供する。

【0014】

この出願は、第3の発明として、前記第1発明のDNAアレイを用いて遺伝子の一塩基多型を検出する方法であって、以下のステップ：

(a) 被験遺伝子から、標識ポリヌクレオチドを調製するステップ；

(b) 標識ポリヌクレオチドをプローブ付固相基体に接触させるステップ；  
(c) DNAアレイ上のプローブにハイブリダイズした標識ポリヌクレオチドより得られるシグナルを測定するステップ；  
を含むことを特徴とする一塩基多型の検出方法を提供する。

【0015】

この第3発明の方法においては、前記ステップ(c)において測定された、前記第1のプローブスポット群と前記第2のプローブスポット群のそれぞれのシグナルを比較することをさらに好ましい態様としている。

【0016】

この出願は、第4の発明として、前記第1発明のDNAアレイを用いて、遺伝子の一塩基多型を検出するための適切なプローブ長を決定する方法であって、以下のステップ：

(a) 被験遺伝子から、標識ポリヌクレオチドを調製するステップ；  
(b) 標識ポリヌクレオチドをDNAアレイに接触させるステップ；  
(c) DNAアレイ上の各プローブに結合した標識ポリヌクレオチドの標識シグナルを測定し、

以下の基準：

(i) 被験遺伝子がホモ接合性第1多型形態の場合に第1のプローブスポット群に標識シグナルが観察されること、  
(ii) 被験遺伝子がホモ接合性第2多型形態の場合に第2のプローブスポット群に標識シグナルが観察されること、  
(iii) 被験遺伝子がヘテロ接合性多型形態の場合に第1のプローブスポット群と第2のプローブスポット群とに同程度の標識シグナルが観察されること、  
を満たすプローブスポットのプローブ長を、その遺伝子の一塩基多型を検出するための適切なプローブ長と決定することを特徴とする方法を提供する。

【0017】

さらにこの出願は、第5の発明として、遺伝子の一塩基多型を検出するためのDNAアレイであって、遺伝子ポリヌクレオチドにハイブリダイズする配列部分が遺伝子の第1の多型形態に正確に相補的である1以上のプローブからなる第1のプローブスポットと、同配列部分が遺伝子の第2の多型形態に正確に相補的である1以上のプローブからなる第2のプローブスポットとを固相基体上に有し、第1および第2のプローブスポットを構成するプローブ長が、前記第4発明の方法で決定された長さであるDNAアレイを提供する。

【0018】

なおこの出願の発明において、「一塩基多型」とは例えば遺伝子データベース等に登録された遺伝子配列とは異なる一塩基変異を有する場合を言う。従って、データベース等に登録された遺伝子配列が必ずしも野性型（正常型）を意味するわけではなく、また一塩基変異を有する遺伝子の変異遺伝子であるわけでもない。ただし、一塩基の変異が疾患等に関連することが知られている遺伝子については、野性型を「正常型」、一塩基多型を「変異型」と定義することもできる。この出願の発明においては、従って、遺伝子の「第1の多型形態」と「第2の多型形態」とは、基本的に「野性型」および「変異型」を意味するものではなく、以下の説明では、第1の多型形態はデータベース等に登録されている遺伝子配列の形態、第2の多型形態は第1多型形態の配列中の一塩基が他の塩基に置換した配列からなる形態と定義する。

【0019】

この出願の発明における「遺伝子ポリヌクレオチド」とは、具体的には、SNP検出の対象となる遺伝子のゲノムDNA、ゲノムDNAから転写されたmRNA、またはmRNAから合成されたcDNAを意味する。またこのポリヌクレオチドは、複数のヌクレオチド、好ましくは30以上、より好ましくは50以上のヌクレオチドが結合した分子である。

【0020】

この出願の各発明における具体的構成は、発明の実施形態の説明や実施例において詳しく説明する。またこの発明に係る用語や概念は、特別に規定したものを除き、当該技術分



野において通常使用されている範囲のものである。さらにこの発明を実施するために使用する様々な技術は、特にその出典を明示した技術を除いては、公知の文献等に基づいて当業者であれば容易かつ確実に実施可能である。例えば、遺伝子工学および分子生物学的技術は Sambrook and Maniatis, in Molecular Cloning-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989; Ausubel, F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y., 1995等に記載されている。

【発明の効果】

【0021】

第1発明のDNAアレイは、様々な1塩基多型形態に対してより正確にハイブリダイズすることのできる様々なプローブ長からなるプローブスポットを備えている。従って、この第1発明のDNAアレイを用いた第3発明の方法によって、より正確なSNP検出が可能となる。

【0022】

また第4発明の方法によって、SNP検出の対象となる遺伝子毎に適切なプローブ長が決定される。そして、この方法によって、各遺伝子のSNP検出に適したプローブ長からなるプローブスポットを含む第5発明のDNAアレイが提供される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0023】

第1発明のDNAアレイは、1以上のプローブからなる第1のプローブスポット群と、同じく1以上のプローブからなる第2のプローブスポット群とを固相基体上に有している。第1のプローブスポット群を構成する各プローブは、解析対象となる遺伝子ポリヌクレオチドにハイブリダイズする配列部分が、同遺伝子の第1の多型形態に正確に相補的であり、第2のプローブスポット群を構成する各プローブは、同遺伝子ポリヌクレオチドにハイブリダイズする配列部分が、同遺伝子の第2の多型形態に正確に相補的である。そして、第1プローブスポット群と第2プローブスポット群のそれぞれを構成するプローブスポットは、それぞれ長さの異なるプローブによって構成されている。

【0024】

さらに詳しくは、「プローブスポット」とは、1以上、好ましくは $10^3 \sim 10^{13}$ 個の同一プローブ（同一配列、同一長のプローブ）の集団が他のプローブスポットと分離されて存在する領域を言う。「プローブスポット群」とは、同一配列で、かつ長さの異なるプローブからなるプローブスポットの集団を意味する。この集団は、一つの好ましい態様として、2～10のプローブスポットからなる集団である。またこれらのプローブスポットは、それを構成するプローブの長さの順に整列配置されていることを好ましい態様としている。以下、このように整列配置されているプローブスポット群を「プローブスポット列」と記載することがある。さらに、第1プローブスポット列と第2プローブスポット列は、互いに同一プローブ長からなるプローブスポットが相対向してもよい。

【0025】

図1は、第1発明のDNAアレイの構成例である。この第1図の例では、第1プローブスポット（黒丸）の列と、第2プローブスポット（白丸）の列は、それぞれ8個のプローブスポットによって構成されている。また、各プローブスポットは、それぞれに含まれるプローブが長→短の順に1～8段目までに整列配置されている。すなわち、第1段目の第1プローブスポット列と第2プローブスポット列のそれぞれを構成するプローブはn個のヌクレオチドであり（n mer）、以下第2段目スポットのプローブから順に、n-1 mer、n-2 mer、n-3 mer、n-4 mer、n-5 mer、n-6 mer、n-7 merである。この場合の「n」は10～100程度、好ましくは20～50程度である。

【0026】

「長さの順番」は長→短の順番であってもよく、短→長の順番であってもよい。また、プローブ長の違いは1塩基ずつの違いでもよく、あるいは2または3塩基ずつの違いであってもよい。さらに、この図1の例では第1プローブスポット列と第2プローブスポット列

のそれぞれのスポットを縦方向（上から下）に配置しているが、横方向（右から左）に配置してもよい。

#### 【0027】

さらにまた、同一プローブ（同一配列、同一長のプローブ）からなるプローブスポット 2～5 個程度を整列配置するようにしてもよい。例えば、図 2 は、第 1 プローブスポット列と第 2 プローブスポット列の各段には、同一プローブからなる 3 個のプローブスポットがそれぞれ並列配置されている。すなわち、同一プローブからなる複数のプローブスポットの存在によって、個々のプローブスポットに含まれるプローブ数に若干の変動による影響を排除することができる。

#### 【0028】

第 1 発明の DNA アレイは、以上のとおりのプローブスポット群（好ましくはプローブスポット列）を配置することを除き、通常の DNA アレイと同様にして作製することができる。DNA アレイの作製方法としては、固相担体表面で直接プローブを合成する方法（オン・チップ法）と、予め調製したプローブを固相基体表面に固定する方法とが知られているが、この発明の DNA アレイは後者の方法で作製することが好ましい。予め調製したプローブを固相基体表面に固定する場合には、官能基を導入したプローブを合成し、表面処理した固相基体表面にプローブを点着し、共有結合させる（例えば、Lamture, J.B. et al. Nucl. Acids Res. 22:2121-2125, 1994; Guo, Z. et al. Nucl. Acids Res. 22:5456-5465, 1994）。プローブは、一般的には、表面処理した固相基体にスパーサーやクロスリンカーを介して共有結合させる。ガラス表面にポリアクリルアミドゲルの微小片を整列させ、そこにプローブを共有結合させる方法（Yershov, G. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:4913, 1996）、あるいはポリ-L-リジン被覆した固相基体にプローブを結合する方法（特開 2001-186880 号公報）も知られている。また、シリカマイクロアレイ上に微小電極のアレイを作製し、電極上にはストレプトアビジンを含むアガロースの浸透層を設けて反応部位とし、この部位をプラスに荷電させることでビオチン化プローブを固定し、部位の荷電を制御することで、高速で厳密なハイブリダイゼーションを可能にする方法も知られている（Sosnowski, R.G. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:1119-1123, 1997）。この発明の DNA アレイは、以上のいずれの方法によっても作製することができる。また、プローブを固相基体表面に滴下させてスポットニングを行う場合には、ピン方式（例えば米国特許第 5,807,522 号）によって行うこともできるが、特開 2001-116750 号公報や特開 2001-186881 号公報に開示されているインクジェット方式を採用することが、均一で一定形状のスポット形成のために好ましい。また、このインクジェット方式では、個々のプローブスポットに含まれるプローブ数を等しくすることができるため、プローブ長の違いによるハイブリダイゼーションの違いを正確に測定することができる。さらに、特開 2001-186880 号公報に開示されているような、スポットニング重ね打ちを行うこと、あるいは WO 03/038089 A1 号パンフレットに開示された組成からなるプローブ溶液（保湿性物質を含む溶液）を使用することも、好ましいスポット形成のために推奨される。

#### 【0029】

スポットニングの後には、冷却、スポットに対する水分付加（湿度～80%程度に一定時間保持）、焼成乾燥による固定化処理等を行うことによって、各スポットを固相基体上に固定するし、DNA アレイを完成することができる。

#### 【0030】

なお、DNA アレイの固相基体は、通常の DNA アレイに使用されるガラス（スライドガラス）の他、プラスチック、シリコン、セラミック等を使用することもできる。

#### 【0031】

第 2 発明は、前記の DNA アレイを含むことを特徴とする一塩基多型検出用のキットである。このキットは、例えば、DNA アレイ、プライマー、PCR 緩衝液、dNTP、MgCl<sub>2</sub>、Taq DNA ポリメラーゼ等によって構成することができる。

#### 【0032】

第 3 発明の方法は、前記第 1 発明の DNA アレイを用いて遺伝子の一塩基多型を検出す

る方法であって、以下のステップを必須として含むことを特徴としている。

(a) 被験遺伝子から、標識ポリヌクレオチドを調製するステップ。

(b) 標識ポリヌクレオチドをプローブ付固相基体に接触させるステップ。

(c) DNAアレイ上のプローブにハイブリダイズした標識ポリヌクレオチドより得られるシグナルを測定するステップ。

#### 【0033】

ステップ(a)における被験遺伝子は、SNPの存在が知られている遺伝子であり、その標識ポリヌクレオチドは、例えば既存のSNPデータベース（例えば [http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/index\\_ja.html](http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/index_ja.html)）等で公開されているプライマーセットを用いて、被験者から単離したゲノム遺伝子またはトータルRNAからのPCR産物（cDNA）として調製することができる。このPCR増幅の際に、標識プライマー（例えばシアニン系有機色素；Cy3、Cy5などを結合したプライマー）を取り込ませて標識ポリヌクレオチドとする。

#### 【0034】

ステップ(b)では、標的ヌクレオチド配列をDNAアレイに接触させ、DNAアレイのプローブにハイブリダイズさせる。ハイブリダイゼーションは、96穴もしくは384穴プラスチックプレートに分注して標識ポリヌクレオチド水性液を、DNAアレイ上に点着することによって実施することができる。点着の量は、1~100 nl程度とすることができる。ハイブリダイゼーションは、室温~70℃の温度範囲で、1~20時間の範囲で実施することが好ましい。ハイブリダイゼーション終了後、界面活性剤と緩衝液との混合溶液を用いて洗浄を行い、未反応の標識ポリヌクレオチドを除去する。界面活性剤としては、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）を用いることが好ましい。緩衝液としては、クエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、トリス緩衝液、グッド緩衝液等を用いることができるが、クエン酸緩衝液を用いることが好ましい。

#### 【0035】

そして、ステップ(c)において、プローブにハイブリダイズした標識ポリヌクレオチドより得られるシグナルを測定する。そして、得られたシグナルから、例えば、以下のとおりにSNPを検出する。

#### 【0036】

まず、得られたシグナルのカットオフ値を20,000とし、第1プローブスポット群と第2プローブスポット群の少なくともどちらか一方のシグナルが、20,000以上の部分の第1プローブスポット群と第2プローブスポット群のシグナル比（第1/第2）を算出し、  
(1)シグナル比が $>5$ の時は被験遺伝子をホモ接合性第1多型形態と判定する。  
(2)シグナル比が $<0.2$ の時は被験遺伝子をホモ接合性第2多型形態と判定する。  
(3)さらに、シグナル比が $0.2$ 以上 $5$ 以下の時は被験遺伝子をヘテロ接合性多型形態と判定する。

#### 【0037】

更に別の判定方法としては、図1に例示したDNAアレイを用いた場合に、第1プローブスポット列を構成する8個のスポット全てにシグナルが観察され、第2プローブスポット列を構成する4個のスポットにシグナルが観察された場合には、前記(1)に該当し、この被験遺伝子はホモ接合性第1多型形態と判定される。あるいはまた、第1プローブスポット列と第2プローブスポット列のそれぞれから同数のシグナルスポットが得られた場合であっても、第1プローブスポット列のシグナルスポットのシグナル強度の総和が第2プローブスポット列のそれより多い場合には、前記(1)に該当し、この被験遺伝子はホモ接合性第1多型形態と判定される。

#### 【0038】

また前記(3)の判定基準は、シグナルスポットの数が同一であり、それぞれのシグナル強度の総和が30%以下、好ましくは20%以下、より好ましくは10%以下である場合とすることもできる。

#### 【0039】

すなわち、従来方法では、それぞれ単一の第1プローブスポットと第2プローブスポッ

トのシグナル強度の多寡を比較するのに対し、この第3発明の方法では、それぞれ複数個のスポットからなるプローブスポット群からより多くのシグナルを発するスポット数を測定し、それを比較する。これによって、従来方法に比べてはるかに高精度でSNPを検出することが可能となる。

#### 【0040】

なお、第3発明における標識ポリヌクレオチドの調製や、ハイブリダイゼーション手続等は、例えば特開2001-095574号公報を初め、多くの特許文献、非特許文献に記載されており、それらの文献記載の方法を適宜に採用して行うことができる。

#### 【0041】

第4発明の方法は、前記第1発明のDNAアレイを用いて、各遺伝子の一塩基多型を検出するための適切なプローブ長を決定する方法である。具体的には、前記第3発明の方法でSNPを検出する際に最も適したプローブ長、すなわち、それぞれの1塩基多型形態を最も正確に反映することのできるプローブ長が、この第4発明において決定されるプローブ長となる。従って、被験者のSNP検出を目的とした第3発明の方法によって得られるデータから、適切なプローブ長を得ることができる。

#### 【0042】

そして、各遺伝子について適切なプローブ長からなるプローブスポットをそれぞれに備えた第5発明のDNAアレイが提供される。この第5発明のDNAアレイは、一つの被検遺伝子に対して、それぞれ「一つ」の第1プローブスポットと第2プローブスポットを備えている。それぞれのプローブスポットを構成するプローブは、その遺伝子のSNPを検出するための最適の長さである。従って、この第5発明のDNAアレイは、第1発明のDNAアレイと比較してはるかに多くの遺伝子のSNP検出を対象とするプローブスポットを備えることができ、しかもSNP検出制度は第1発明のDNAアレイと実質的に同一である。

#### 【0043】

以下、実施例を示してこの出願の発明をさらに詳細かつ具体的に説明するが、この出願の発明は以下の例によって限定されるものではない。

#### 【実施例1】

#### 【0044】

##### (1) DNAアレイの作成

遺伝子GNB3、MTHFRのそれぞれのポリヌクレオチド(cDNA)にハイブリダイズする配列部分がそれぞれの遺伝子の第1多型形態に正確に相補的である第1プローブ、同じく配列部分が第2多型形態に正確に相補的である第2プローブを、それぞれ1塩基異なる長さで合成した。各プローブの塩基配列は、遺伝子GNB3用の第1プローブはSEQ ID No. 1-8、第2プローブはSEQ ID No. 9-16、遺伝子MTHFR用の第1プローブはSEQ ID No. 17-24、第2プローブはSEQ ID No. 25-32である。また、SEQ ID Nos. 1-32の各塩基配列の5'側には塩基配列「TTTTT」が連結されている。

#### 【0045】

これらのプローブの5'をアミノ基で修飾し、オリゴDNA固定化用エポキシガラス基板に、1スポット当たり、50pmol/ $\mu$ Lの溶液を200pLずつスポットティングした。また、第1プローブスポット列と第2プローブスポット列の構成は、図2に示したように、同一プローブからなるプローブスポットを3個ずつ並列配置した。

#### 【0046】

スポットティング後、42℃、相対湿度50%の条件下で一晩インキュベートした。次に、0.2% SDS水溶液で室温にて2分間洗浄し、さらに滅菌水で室温にて1分間の洗浄を2回行った。最後に50℃の滅菌水中で20分間インキュベートした後、遠心器で1000rpm×5分間遠心し、乾燥した。

##### (2) 標識ポリヌクレオチドの調製

遺伝子型が判明している被験者血液から抽出したDNAをテンプレートとし、以下のPCR条件で増幅を行い、標識ポリヌクレオチドを調製した。

- ・プライマー1: 5pmol (5'末端Cy3標識)
- ・プライマー2: 5pmol
- ・×10緩衝液: 2.5 $\mu$ l
- ・2 mM dNTP: 2.5 $\mu$ l
- ・25 mM MgCl<sub>2</sub>: 2.5 $\mu$ l
- ・Taq DNAポリメラーゼ: 1U
- ・抽出DNA溶液: 20 ng
- ・増幅条件
  - 94℃/5分
  - 94℃/30秒、60℃/30秒、72℃/30秒 (35サイクル)
  - 72℃/2分

(3) ハイブリダイゼーション

前記 (2) で調製した標識ポリヌクレオチドを0.3 N NaOH (終濃度) と混合し、一本鎖に変性した後、200 mMクエン酸-リン酸緩衝液 (pH6.0)、2% SDS、750 mM NaCl、0.1% NaN<sub>3</sub> (全て終濃度) を添加、混合し、サンプルとした。

【0047】

次に、前記 (1) で作製したDNAアレイ上にハイブリダイゼーションサンプルを滴下し、カバーガラスをかけ、55℃、相対湿度100%のモイスターチャンバー内で一晩インキュベートを行った。反応後、カバーガラスをはずし、あらかじめ55℃に加温した2×SSC、1% SDS水溶液に、55℃で20分間浸漬した。次に50 mM Tris-HCl (pH7.5)、0.025% Tween20水溶液に15分間浸漬した後、遠心器で1000 rpmで5分間遠心し、乾燥した。

(4) シグナル測定

Scan Array (Packard BioScience社製) にて、レーザーパワー100%、フォトマル100%で蛍光画像を測定した。得られた画像は図3、4に示したとおりである。また、得られた画像シグナルをGenePix Pro (Axon社製) にて数値化した (表1-3)。

【0048】

蛍光シグナルのカットオフ値を20,000とし、第1プローブと第2プローブの少なくともどちらか一方の蛍光シグナルが20,000以上の部分の第1プローブと第2プローブの蛍光シグナル比 (第1/第2) を算出した。蛍光シグナル比が>5の時はホモ接合型第1多型形態、<0.2の時はホモ接合型第2多型形態、0.2以上5以下の時はヘテロ接合性多型形態と判定したところ、事実と一致したことが確認できた。

【0049】

【表1】

プローブ名	シグナル平均値		プローブ名	シグナル平均値
GNB3C-01	58708		GNB3T-01	53770
GNB3C-02	59917		GNB3T-02	61692
GNB3C-03	51209		GNB3T-03	62803
GNB3C-04	58654		GNB3T-04	26074
GNB3C-05	59910		GNB3T-05	12235
GNB3C-06	49292		GNB3T-06	4232
GNB3C-07	11455		GNB3T-07	287
GNB3C-08	7982		GNB3T-08	-
MTHFRC-01	52477		MTHFRT-01	49964
MTHFRC-02	28938		MTHFRT-02	37235
MTHFRC-03	24547		MTHFRT-03	682
MTHFRC-04	23134		MTHFRT-04	402
MTHFRC-05	19816		MTHFRT-05	1895
MTHFRC-06	9657		MTHFRT-06	540
MTHFRC-07	1103		MTHFRT-07	327
MTHFRC-08	-		MTHFRT-08	-

【0050】

【表 2】

プローブ名	シグナル平均値	プローブ名	シグナル平均値
GNB3C-01	43057	GNB3T-01	54237
GNB3C-02	48372	GNB3T-02	51780
GNB3C-03	49170	GNB3T-03	46744
GNB3C-04	46289	GNB3T-04	48697
GNB3C-05	39406	GNB3T-05	52358
GNB3C-06	35536	GNB3T-06	43055
GNB3C-07	6042	GNB3T-07	8489
GNB3C-08	2768	GNB3T-08	216
MTHFRC-01	63347	MTHFRT-01	53418
MTHFRC-02	54415	MTHFRT-02	59295
MTHFRC-03	43163	MTHFRT-03	15571
MTHFRC-04	28148	MTHFRT-04	16884
MTHFRC-05	24618	MTHFRT-05	25909
MTHFRC-06	9163	MTHFRT-06	8836
MTHFRC-07	2727	MTHFRT-07	-
MTHFRC-08	-	MTHFRT-08	-

【0051】

【表 3】

プローブ名	シグナル平均値	プローブ名	シグナル平均値
GNB3C-01	58342	GNB3T-01	61200
GNB3C-02	54327	GNB3T-02	60863
GNB3C-03	8830	GNB3T-03	59395
GNB3C-04	1245	GNB3T-04	61301
GNB3C-05	-	GNB3T-05	40213
GNB3C-06	-	GNB3T-06	19563
GNB3C-07	-	GNB3T-07	2692
GNB3C-08	-	GNB3T-08	640
MTHFRC-01	25461	MTHFRT-01	63825
MTHFRC-02	10030	MTHFRT-02	54577
MTHFRC-03	2625	MTHFRT-03	34217
MTHFRC-04	1333	MTHFRT-04	46260
MTHFRC-05	626	MTHFRT-05	54278
MTHFRC-06	229	MTHFRT-06	37178
MTHFRC-07	-	MTHFRT-07	6861
MTHFRC-08	-	MTHFRT-08	979

【産業上の利用可能性】

【0052】

以上詳しく説明したとおり、この出願の発明は、より正確な SNP 検出を可能とする DNA アレイと、この DNA アレイを用いて正確な SNP 検出を行う方法に関するものである。またこの出願の発明は、SNP 検出の対象となる遺伝子に応じた適切なプローブ長を決定する方法と、この方法により決定されたプローブ長からなるプローブを備えた DNA アレイに関するものである。これらの発明によって、疾患易罹患性や薬剤反応性に関連する遺伝子の探索、あるいはテーラーメイド医療のための重要な遺伝子情報としての SNP を正確かつ再現性よく検出することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0053】

【図 1】 この発明の DNA アレイの構成例を示した模式図である。

【図 2】 この発明の DNA アレイの別の構成例を示した模式図である。

【図 3】 この発明の DNA を用いた遺伝子 GNB3 の SNP 検出例を示した蛍光画像である。

【図 4】 この発明の DNA を用いた遺伝子 MTHFR の S N P 検出例を示した蛍光画像である。

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> TOYOBO and NGK Insulators, Ltd.

<120> DNA Array and Method for Detecting Single Nucleotide Polymorphism

<130>

<160>

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 1

GGCATCACGT CCGTGGCCTT CTCCC

25

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 2

GCATCACGTC CGTGGCCTTC TCCC

24

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 3

GCATCACGTC CGTGGCCTTC TCC

23

<210> 4

<211> 22

<212> DNA



<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 4

CATCACGTCC GTGGCCTTCT CC

22

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 5

CATCACGTCC GTGGCCTTCT C

21

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 6

ATCACGTCCG TGGCCTTCTC

20

<210> 7

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 7

ATCACGTCCG TGGCCTTCT

19

<210> 8

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

&lt;400&gt; 8

TCACGTCCGT GGCCTTCT

18

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

&lt;400&gt; 9

GGCATCACGT CTGTGGCCTT CTCCC

25

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

&lt;400&gt; 10

GCATCACGTC TGTGGCCTTC TCCC

24

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

&lt;400&gt; 11

GCATCACGTC TGTGGCCTTC TCC

23

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 12  
CATCACGTCT GTGGCCTTCT CC 22

<210> 13  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 13  
CATCACGTCT GTGGCCTTCT C 21

<210> 14  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 14  
ATCACGTCTG TGGCCTTCTC 20

<210> 15  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 15  
ATCACGTCTG TGGCCTTCT 19

<210> 16  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 16

TCACGTCTGT GGCCTTCT

18

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

&lt;400&gt; 17

GTCTGCGGGA GCCGATTTCAT TCATC

25

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

&lt;400&gt; 18

GTCTGCGGGA GCCGATTTCAT TCAT

24

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

&lt;400&gt; 19

TCTGCGGGAG CCGATTTCAT CAT

23

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

&lt;400&gt; 20

TCTGCGGGAG CCGATTTCAT CA

22

<210> 21  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial  
  
<220>  
<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide  
  
<400> 21  
CTGCGGGAGC CGATTTCATC A 21

<210> 22  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial  
  
<220>  
<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide  
  
<400> 22  
CTGCGGGAGC CGATTTCATC 20

<210> 23  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial  
  
<220>  
<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide  
  
<400> 23  
TGCGGGAGCC GATTTCATC 19

<210> 24  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial  
  
<220>  
<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide  
  
<400> 24  
TGCGGGAGCC GATTTCAT 18

<210> 25

<211> 25  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 25

GTCTGCGGGA GTCGATTCA TCATC

25

<210> 26

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 26

GTCTGCGGGA GTCGATTCA TCAT

24

<210> 27

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 27

TCTGCGGGAG TCGATTTCAT CAT

23

<210> 28

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 28

TCTGCGGGAG TCGATTTCAT CA

22

<210> 29

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 29

CTGCGGGAGT CGATTTTCATC A

21

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 30

CTGCGGGAGT CGATTTTCATC

20

<210> 31

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 31

TGCGGGAGTC GATTTTCATC

19

<210> 32

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

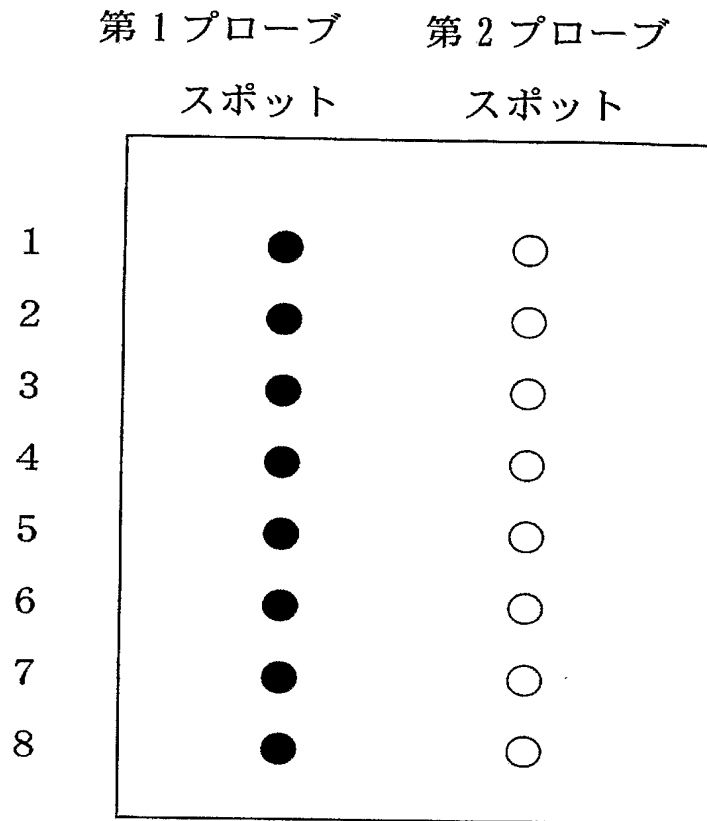
<223> Descriptoin of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 32

TGCGGGAGTC GATTTTCAT

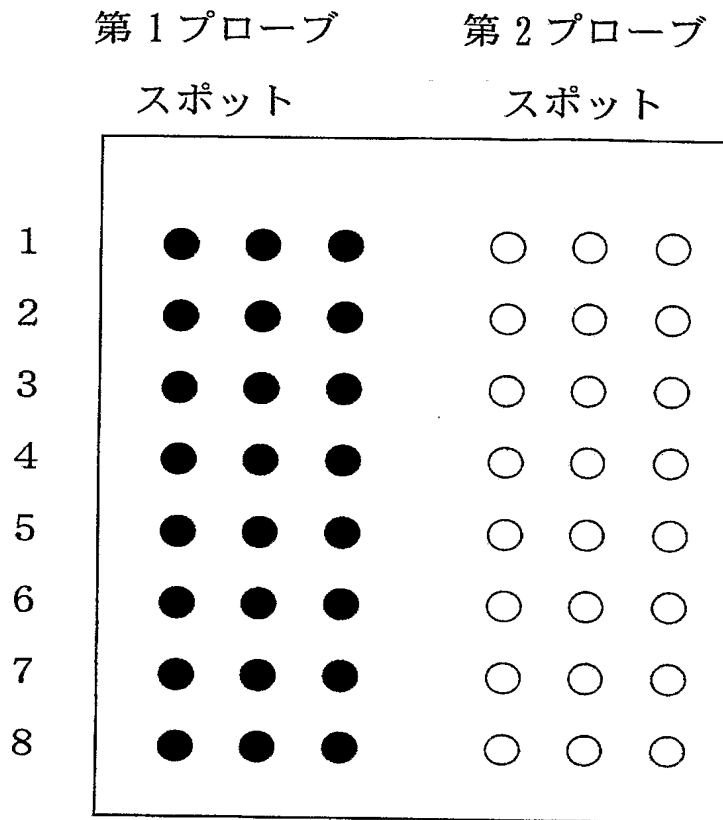
18

【書類名】 図面  
【図 1】

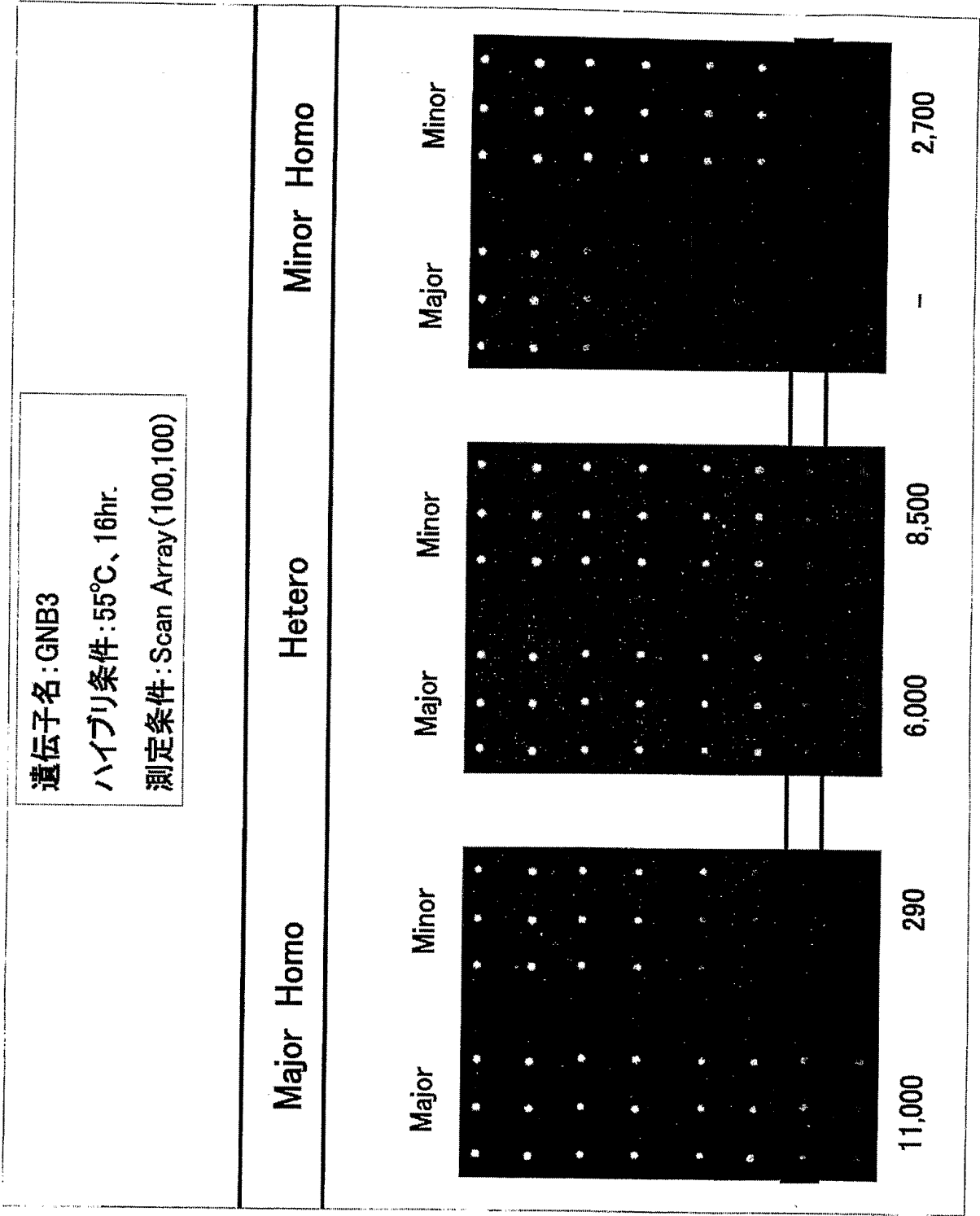




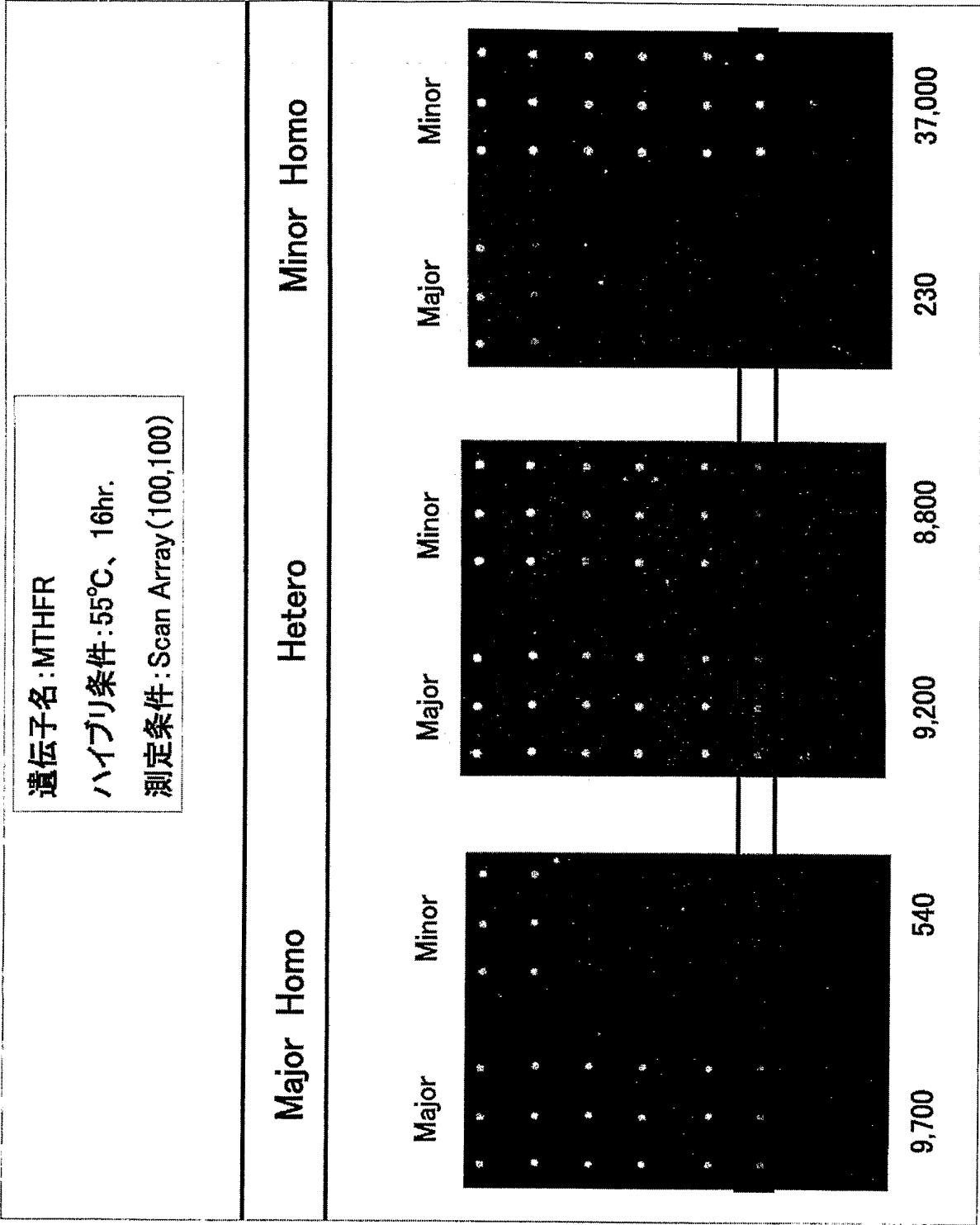
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【目的】 より正確な SNP 検出を可能とする DNA アレイと、この DNA アレイを用いた SNP 検出方法を提供する

【構成】 遺伝子の一塩基多型を検出するための DNA アレイであって、遺伝子ポリヌクレオチドにハイブリダイズする配列部分が遺伝子の第 1 の多型形態に正確に相補的である 1 以上のプローブからなる第 1 のプローブスポット群と、同配列部分が遺伝子の第 2 の多型形態に正確に相補的である 1 以上のプローブからなる第 2 のプローブスポット群とを固相基体上に有し、第 1 プローブスポット群と第 2 プローブスポット群のそれぞれを構成するプローブスポットは、プローブスポット毎にプローブの長さが異なる。

【選択図】 図1

特願 2 0 0 4 - 0 8 1 0 3 4

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 0 0 0 0 0 3 1 6 0 ]

1. 変更年月日	1 9 9 0 年 8 月 1 0 日
[変更理由]	新規登録
住 所	大阪府大阪市北区堂島浜 2 丁目 2 番 8 号
氏 名	東洋紡績株式会社

特願 2 0 0 4 - 0 8 1 0 3 4

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 0 0 0 0 4 0 6 4 ]

1. 変更年月日 1 9 9 0 年 8 月 2 4 日

[変更理由] 新規登録

住 所 愛知県名古屋市瑞穂区須田町 2 番 5 6 号

氏 名 日本碍子株式会社